

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

MICROCAPSULE USING REGENERATED NATURAL KERATIN AS WALL MATERIAL AND ITS PRODUCTION

Patent Number: JP5285374
Publication date: 1993-11-02
Inventor(s): YAMAUCHI KIYOSHI
Applicant(s):: KIYOSHI YAMAUCHI; others: 01
Requested Patent: ☐ JP5285374
Application Number: JP19920116819 19920409
Priority Number(s):
IPC Classification: B01J13/04 ; A61K9/50 ; A61K47/42 ; B01J13/02 ; C08L89/04
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE:To produce microcapsules using regenerated natural keratin as the wall material, excellent in uniformity, stability and adaptability to a living body and having a high core content by using keratin not subjected to chain shortening treatment by breaking of peptide bonds or other irreversible chemical modification.

CONSTITUTION:Keratin is extracted from a keratin-contg. material by treatment with a reducing agent in a liq. medium and the reducing agent is removed from the resulting liq. extract to obtain water-soluble keratin. An aq. soln. of the water-soluble keratin is mixed with an org. solvent insoluble or slightly soluble in water and the mixture is subjected to ultrasonic treatment and/or vigorous stirring. The objective microcapsules using regenerated natural keratin as the wall material are produced.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-285374

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
B 0 1 J . 13/04				
A 6 1 K 9/50	A	7329-4C		
47/42	D	7433-4C		
		8317-4G	B 0 1 J 13/ 02	A
		8317-4G		L

審査請求 未請求 請求項の数8(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-116819
(22)出願日 平成4年(1992)4月9日

(71)出願人 592005788
山内 清
大阪府河内長野市北青葉台27-19
(71)出願人 000000952
鐘紡株式会社
東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(72)発明者 山内 清
大阪府河内長野市北青葉台27-19
(74)代理人 弁理士 赤岡 迪夫

(54)【発明の名称】 再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセル及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、ペプチド結合切断による短鎖化処理その他の非可逆的化学修飾を伴わないケラチンを壁材として含む、均一性、安定性及び生体適合性等に優れ且つ含包量が大きい再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセル及びその製造方法の提供を目的とする。

【構成】 ケラチン含有物質を液体媒体中にて還元剤により処理してケラチンを抽出し該抽出液より前記還元剤を除去することにより得られる水溶性ケラチンを壁材として不溶化してなるマイクロカプセル及び、前記水溶性ケラチンの水溶液を水に不溶性又は難溶性の有機溶媒と混合しこれを超音波処理及び／又は激しく攪拌することを特徴とする、再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセル。

【請求項2】該再生天然ケラチンが、ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンを、マイクロカプセルの壁の形態に不溶化させてなるものである、請求項1に記載のマイクロカプセル。

【請求項3】マイクロカプセルの壁材が、ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンと、メルカプト基若しくはジスルフィド結合を有するタンパク質若しくはポリペプチド及び／又はメルカプト基若しくはジスルフィド結合を担持したポリビニルアルコールとの混合物を、マイクロカプセルの壁の形態に不溶化させてなるものであることを特徴とするマイクロカプセル。

【請求項4】ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンを、壁材原料として芯物質の周囲に被覆させて不溶化させることによりなる、再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項5】ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤で処理してケラチンを抽出することにより得られる水溶性ケラチンと、メルカプト基若しくはジスルフィド結合を有するタンパク質若しくはポリペプチド及び／又はメルカプト基若しくはジスルフィド結合を担持したポリビニルアルコールとの混合物を、壁材原料として芯物質の周囲に被覆させこれを不溶化させることによりなるマイクロカプセルの製造方法。

【請求項6】該壁材原料を含む水溶液を水に不溶性又は難溶性の液状物質である芯物質と混合し、これを超音波処理及び／又は激しく攪拌することを特徴とする、請求項4又は5に記載の製造方法。

【請求項7】チオール基をジスルフィド結合に変換し得る酸化剤を前記超音波処理及び／又は激しい攪拌の前に添加し攪拌することを特徴とする、請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】該超音波処理及び／又は激しい攪拌を酸化能力を欠くガス雰囲気下に行った後、チオール基をジスルフィド結合に変換し得る酸化剤を添加し攪拌することとを特徴とする、請求項6に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、再生天然ケラチンを壁材として含有する、染料、香料、医薬品、農薬、酵素その他の薬剤の包含に又は酵素等の固定化に好適なマイクロカプセル及びその製造方法に関する。本明細書において「再生天然ケラチン」とは、天然のケラチンに対して酵素等によるペプチド結合の加水分解処理を加えることなく、かつその他の非可逆的化学処理をも加えることな

く、ジスルフィド結合を還元してチオール基としてケラチンを一旦可溶化した後、再度チオール基同士をジスルフィド結合させることにより再度不溶化してなる、再生した高分子をいう。

【0002】

【従来の技術】従来、医薬品等を包含させて安定性や放出特性その他の種々の性質を改善する等の目的でマイクロカプセルが開発されている。

【0003】マイクロカプセルの壁材として使用される材料物質には、簡単な装置と方法によりマイクロカプセルを製造できる等取扱が容易であることや、得られるマイクロカプセルがカプセル自体の量に対する薬剤等の包含量が大きいものであることが求められる。更に医薬品や農薬等に使用するマイクロカプセルにおいては特に、生体適合性に優れること、取り分け毒性上問題となる架橋剤を使用せずに製造できるものであること、生分解性を有すること等の特徴が求められる。このためには、医薬品等に使用し得るマイクロカプセルの壁材原料としては生体物質を天然の又はこれに極めて近い状態で用いることが好ましい。

【0004】また、マイクロカプセルの製造には、マイクロカプセル壁材原料の性質等に応じて種々の方法が知られているが、特に医薬品等に使用し得るマイクロカプセルを製造するためには、壁材原料の有する生体適合性を損なわない方法である必要があり、従ってマイクロカプセル壁材原料もそのような方法を適用できる原料であることが要求される。

【0005】一方、爪や毛髪、羊毛等の獣毛や羽毛中には構造タンパク質としてケラチンが存在するが、ケラチンそのものを壁材とするマイクロカプセル化は検討されていない。わずかに関連技術として、ペプシン等のタンパク質分解酵素によるペプチド鎖の加水分解処理を経たケラチン（以下「ケラチン加水分解物」という。）を用いたマイクロカプセルが開示されている（特公昭59-33017号）。しかし、該技術においては、タンパク質分解酵素による処理で一旦分解されたペプチド鎖の修復処理は何ら示されておらず、従って、該ケラチン加水分解物が鎖断片間のジスルフィド結合による架橋形成によってポリマー化してカプセル壁を構成した後も、切断された各ケラチン鎖は修復を受けないままであり、天然のケラチンを再生したものではない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】かかる状況のもとで、本発明は、ペプチド結合の切断による低分子量化処理その他の非可逆的化学修飾を伴わない、再生天然ケラチンを壁材とする、生体適合性、生分解性の点で好ましい且つ薬剤等の包含量が大きいマイクロカプセル及びその製造方法を提供せんとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題の達成のため、

本発明者は、ケラチン含有物質より、ペプチド結合の分解処理を経ることなく天然のケラチンを抽出してマイクロカプセルを製造する方法について種々検討した。その結果、ケラチン含有物質から、タンパク質分解酵素による加水分解処理その他の非可逆的な変成を生ずる処理を施すことなく後述の方法によりケラチンを抽出して処理することにより、再生天然ケラチンよりなるマイクロカプセルを製造することに成功した。また、該方法によって製造されるマイクロカプセルは、前述のケラチン加水分解物を用いた公知のマイクロカプセルと比較して、格段に優れた性質を有することが確認された。

【0008】以下本発明を、マイクロカプセルの壁材原料として用いる水溶性ケラチンの製造段階〔I〕と、該水溶性ケラチンを用いてマイクロカプセルを製造する段階〔II〕とに分けて順次説明する。

〔I. 加水分解処理その他の非可逆的化学修飾を伴わないケラチン抽出方法及び結果〕本段階は、ケラチン含有物質を液体媒体中において還元剤と共に攪拌することにより還元して可溶化・抽出し、得られた抽出液より不溶物を除去し、界面活性剤の存在下に透析その他の適当な手段で還元剤を除去することを特徴とする。

【0009】上記ケラチン含有物質としては、人毛、羊毛その他の獣毛、羽毛、ひづめ等、真正ケラチンを含有する物質ならいずれも使用することができる。

【0010】上記液体媒体としては、例えば、還元に対して安定であり且つケラチン含有物質に対し親和性のある溶媒を使用することができ、例えば水又はアルコール類若しくはアミド類等やこれらの混合物が好ましく用いられる。該液体媒体の使用量は、ケラチン含有物質を浸漬できる量であればよいが、ケラチン含有物質の使用量の10乃至40重量倍であることが処理上好ましい。

【0011】上記液体媒体には、必須ではないが、特に獣毛、毛髪、角、爪、ひづめ等の可溶化にくい材料の還元可溶化の効率を高める目的で所望により尿素、チオ尿素等の水素結合切断剤、メタノール、エタノール、プロパノール等のアルコール類、塩化亜鉛、ヨウ化ナトリウム、臭化リチウム等の無機塩類、アンモニア、水酸化ナトリウム等を溶解補助剤として加えることもできる。これら溶解補助剤の添加量は適宜であるが、例えば尿素の場合、ケラチン含有物質に対して通常3乃至15重量倍、好ましくは5乃至12重量倍である。

【0012】上記還元にはケラチン含有物質中に存在するケラチンのジスルフィド結合をチオール基に還元し得る還元剤なら一般に用いることができるが、例えばメルカプトエタノール、チオグリコール酸、トルエン- ω -チオール、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール等のチオール系誘導体、トリフェニルホスフィン、トリプロピルホスフィン、トリブチルホスフィン等のリン含有化合物、亜硫酸水素ナトリウム等の無機還元性化合物などが好ましく用いられる。還元剤の使用量は、ケラチ

ン含有物質10gに対して0.01乃至0.50モルとするのが好ましく、0.05乃至0.25モルとするのが更に好ましい。

【0013】還元可溶化は、反応を促進するためにはアルカリ性側で行うのが好ましいが、その場合は通常pH10乃至11の範囲とするのが特に好ましい。反応は所望により加熱して行う。反応温度、反応時間はケラチン含有物質の可溶化の難易に応じて適宜設定することができるが、例えば室温乃至100℃にて1乃至24時間攪拌することができる。

【0014】還元剤の除去の操作中に液体媒体中に存在させる必要のある前記界面活性剤は、通常、ケラチン含有物質を還元可溶化して得た溶液とした後であって、遠心分離、濾過等により不溶物を除去して透析工程を開始するまでの間に該溶液に加える。該界面活性剤としては、例えば、(1)アニオン性界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム等のアルキル硫酸塩、アルキル硫酸エステル塩又は、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩等の硫酸エステル塩、脂肪酸アルコールリン酸エステル塩、スルホコハク酸エステル塩又はナフタレンスルホン酸のホルマリン縮合物等、(2)両性界面活性剤として、ベタイン系界面活性剤等、(3)非イオン性界面活性剤として、ポリオキシエチレンアルキルエーテル型、脂肪酸エステル型、ポリエチレンイミン型、ポリグリセリンエーテル型、エステル型等、(4)カチオン性界面活性剤として4級アンモニウム塩を使用することができる。これらのうち、特にアニオン性界面活性剤が好ましい。界面活性剤の添加により、続く透析等による還元剤除去に際し濁りや沈殿の生ずることが防止され、脱塩精製されたケラチン溶液を得ることが可能となる。

【0015】上記界面活性剤の添加量は、ケラチン溶液の濃度や原料としたケラチン含有物質の種類によって異なり得るため、必ずしも限定されないが、通常例えば0.01乃至5重量%、好ましくは0.1乃至2重量%である。

【0016】還元剤の除去は、透析、電気透析、限外濾過等の適宜の手段によって行い、過剰の界面活性剤が除去されるまで行うことができる。透析外液は例えばイオン交換水とすることができる。また透析外液に還元剤(チオール基のジスルフィド結合への変換を防止できる還元剤)を少量(例えば、2-メルカプトエタノールの場合0.1乃至0.5%)加えておけば、透析中におけるケラチン鎖のチオール基の再酸化によるケラチン鎖の再結合を防止することができる。従って、透析中に酸素その他の酸化剤の共存が考えられる場合には、還元剤を少量添加することが通常好ましい。

【0017】脱塩精製して得られたケラチン水溶液はそのまま、又は限外濾過等により適宜濃度を調整して、或いは使用時まで凍結乾燥その他により一旦乾燥品として保存した後に再度水に溶解して、続くマイクロカプセル

化の段階において使用することができる。該水溶性ケラチンは凍結乾燥その他により乾燥させた後も水溶性であり、アミノ酸100残基当たりシステイン1乃至5個、シスチン0.5乃至3個を含み、平均分子量30000乃至70000である。

【0018】また、上記において使用する界面活性剤は、還元可溶化の後で添加する代わりに還元可溶化に際して添加しておけば、還元可溶化を促進して収率及び抽出速度の双方を高めることが見出された。従って、還元可溶化を一層効率よく行うためには、界面活性剤の存在下において還元可溶化を行うことがより好ましい。また、これに用いる界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤が特に好ましい。かかる方法によれば、典型的には、還元可溶化の後で界面活性剤を加える場合に比べて収率は約10乃至20%増大し、抽出速度は約20乃至70%増大する。

【0019】この場合、液体媒体としては、上述のもののうち、例えば水性溶媒、例えば水又は水とメタノール、エタノール等の水混和性の有機溶媒との混合物を使用するのが特に好ましい。また、界面活性剤存在下での還元可溶化では、反応は十分に促進されているため、通常、反応液のpHをアルカリ性側に特に調整することなく還元可溶化を行う。その他反応条件は界面活性剤を還元可溶化の後に加える場合と同様でよい。

【0020】界面活性剤の存在下に還元可溶化して得られる水溶性ケラチンについても分析を行い、アミノ酸分析でアミノ酸100残基当たりシステインを通常4~10個、シスチンを通常0.5~2個を有すること、及び、電気泳動分析で分子量15000~130000のタンパク質を主成分とすることが確認された。

【0021】なお、還元可溶化反応は超音波照射の下に行うこともできる。超音波照射は、界面活性剤存在下での還元可溶化反応において高められたケラチン収率をも更に高め（例えば、牛角で45%から55%へと高め）、且つ、同等以上の収率を得るために要する反応時間を短縮する（例えば牛角で24時間から8時間へと短縮する）効果を有する。従って、還元可溶化に際し、超音波照射下に行うことが更に有利である。超音波照射は適宜の超音波照射装置を用いて行うことができ、出力は適宜設定できるが、反応液1Lに対して例えば50乃至200Wとすることができる。

【0022】以下に、水溶性ケラチンの製造例を記す。
〔水溶性ケラチン製造例1〕羊毛（化炭ノイル）20gを0.8Mチオグリコール酸カリウム水溶液（pH10.5）300mLに浸漬し、5℃で36時間攪拌を行った。反応物から不溶物を濾過により除去し、イオン交換水で600mLに希釈した。この液にドデシル硫酸ナトリウム（SDS）10gを加えて溶解し、セロファンチューブに入れてイオン交換水（10L）に対して2回透析し、無色透明のケラチン水溶液（650mL）を得

た。

【0023】Lowry法によりこの溶液のタンパク質定量を行ったところ、ケラチン濃度は1.2%であった。また、該水溶液を凍結乾燥して得たケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸100残基当たりシステインが3.3個、シスチンが1.2個であった。また、ポリアクリルアミド-SDS電気泳動法によれば、分子量30000乃至70000のタンパク質が主成分であった。

10 【0024】〔水溶性ケラチン製造例2〕脱脂羊毛（メリノ種）10g、ドデシル硫酸ナトリウム6.0g、亜硫酸水素ナトリウム16g及び8モル濃度の尿素300mLの混合液を密栓のうえ、50乃至55℃にて1時間、浴槽型超音波装置にて処理した。不溶物を濾過して除去し、濾液をセロファンチューブに入れ、外液として0.2重量%亜硫酸水素ナトリウム水溶液（3L）を用いて透析した。透析物より少量の不溶物を遠心により除いて得られた無色透明の水溶液約330mLはケラチンを1.4重量%含有していた（Lowry法によるタンパク質分析による）。またこのケラチンはアミノ酸分析により、アミノ酸100残基当たりシステイン7.6個、シスチン0.8個を有しており、ポリアクリルアミド-SDS電気泳動によれば、分子量約40000及び60000のタンパク質（それぞれ3乃至4割、5乃至6割）を主成分としていた。

30 【0025】〔11.本発明におけるマイクロカプセルの製造方法及び得られるマイクロカプセルの特徴〕上記で得られる水溶性ケラチンを用いて再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルを製造する方法、及びそれによって得られるマイクロカプセルの特徴を以下に説明する。上記で得られるケラチン水溶液をそのまま、又は限外濾過等により濃度を適宜調整し、或いは凍結乾燥等により一旦乾燥させたものを再度水溶液として、以下の工程で使用することができる。

40 【0026】なお、上記で得られた水溶性ケラチンは、タンパク質分解酵素等によるペプチド鎖切断処理を経ないため、ケラチン加水分解物に比して膜の形成能が著しく高く（試験例1を参照）、マイクロカプセルの効率的な製造には格段に有利である。しかも、上記で得られる水溶性ケラチンより製造されるマイクロカプセルは、ケラチン加水分解物から製造されるマイクロカプセルに比して格段に優れた安定性を有する（比較例1を参照）。

50 【0027】また、上記で得られた水溶性ケラチンよりマイクロカプセルを製造するためには、例えば、相分離法、噴霧凝固造粒法その他マイクロカプセルの製造方法として知られている種々の方法のいずれを用いることもでき、いずれの方法でも、安定で生体適合性の点で好ましいマイクロカプセルが容易に製造できる。なお、とりわけ微細かつ均一な粒径を有しカプセル壁が極めて薄く

且つ安定性が高い、という特段の特徴を備えたマイクロカプセルの製造を目的とする場合には、後述の超音波法が、極めて簡便にこの目的の達成を可能にするから、特に好ましい。

【0028】〔1. 好ましい各方法の概要〕以下(1)乃至(4)に本発明のマイクロカプセルの各種製造方法のうち、好ましい主要なものの概要を示す。

【0029】(1) 超音波照射法： ケラチン水溶液と、水に不溶性又は難溶性の有機溶媒等(例えばトルエン、ヘキサン等の有機溶媒又は油状の薬物等)との混合物(ケラチン水溶液/有機溶媒等の体積比は当該マイクロカプセルの製造目的に応じて変化するが、通常0.1乃至10)を、例えば0℃乃至50℃の温度範囲にて、例えば10秒乃至10分間超音波照射する。ケラチンのアミノ酸残基のうちシステイン残基が有するメルカプト基がジスルフィド結合へと変化することによってケラチン鎖間に架橋形成がなされる結果、水溶性のケラチンが水に不溶の再生天然ケラチンとなって前記溶媒等の微細な粒子表面上に極めて薄い安定な皮膜を形成し、当該溶媒等を芯物質として効率的に閉じ込めてなる均一な粒径のマイクロカプセルが得られる(実施例3及び4を参照)。

【0030】(2) 振動・攪拌法： 上記(1)の混合物(ケラチン水溶液及び溶媒の)に過酸化水素、過ヨウ素酸ナトリウムなどSH基を酸化してジスルフィド結合に変換することのできる酸化剤を加えた後、ボルテックスミキサーや攪拌モーターなどで激しく振動・攪拌する。超音波法と同様な簡便な操作で、再生天然ケラチンを壁材とするマイクロカプセルが製造できる(実施例5を参照)。

【0031】(3) 上記二方法の変法： 上記(1)の混合物を、窒素ガスなど酸化能力を欠くガス雰囲気下にて、超音波照射装置、ボルテックスミキサーや攪拌モーターなどで激しく振動・攪拌して乳濁液とした上で、上記(2)で述べた酸化剤を加えて攪拌する方法(実施例6を参照)。

【0032】(4) 他の壁材成分を加えた方法： ケラチン水溶液と他のタンパク質水溶液の混合物、又はケラチン水溶液と非タンパク質でSH基もしくはジスルフィド結合を持つ化合物の水溶液との混合物を壁材原料として用い、上記(1)乃至(3)に記載の方法で処理して再生天然ケラチンを壁材として含むマイクロカプセルを製造する(実施例7及び8)。混合する他成分に応じて、得られるマイクロカプセルの性質を変化させることが可能となる。

【0033】上記(1)乃至(4)において、あらかじめ有機溶媒等に染料、香料、医薬品などの物質を溶かしたものを使用すれば、これらは芯物質として効率よくマイクロカプセル内に含包される(実施例8及び9)。

【0034】〔2. 公知成分〕以下に本発明のマイクロ

カプセルの製造に用いる公知成分について詳細に説明する。

(i) ケラチン含有水溶液： 下記のケラチン水溶液(i-a)単独、該ケラチン水溶液(i-a)に以下の(i-b)若しくは(i-c)に記載の物質を加えた混合物、又は該ケラチン水溶液(i-a)に(i-b)と(i-c)とを加えた混合物である。

【0035】(i-a) ケラチン水溶液： ケラチン原料として羊毛、人髪、鶏羽、犬毛、牛角などケラチンを含むものを用いて上記の方法で製造したケラチンの水溶液である。

【0036】(i-b) ケラチン水溶液と混合される他のタンパク質またはペプチド： コラーゲン、ゼラチン、フィブリノーゲン、シルク、卵白リゾチーム、インスリンなどのメルカプト基やジスルフィド結合を有するタンパク質；グリシル-グリシル-システイン(Gly-Gly-Cys)や(グリシル-グリシル-シスチン)₂[(Gly-Gly-Cyt)₂]などのペプチド。またはこれらに存在する複数のジスルフィド結合の全部または一部が還元されてメルカプト基となっているもの。

【0037】(i-c) 非タンパク質でメルカプト基またはジスルフィド基を持つもの： SH基を担持せしめたポリビニルアルコール(例：平均分子量2000に対してSH基が1乃至20個)などの高分子の水溶液、およびグルタチオン、2-メルカプトエタノールなど。

【0038】(ii) 有機溶媒等： 本発明に使用する有機溶媒としては、水に難溶なトルエン、キシレン、ヘキサン、デカン、シクロヘキサンなどの炭化水素系溶媒が最も好ましいが、ジエチルエーテルなどのエーテル型溶媒やフルオロシクロヘキサン、フロン113などの含ハロゲン炭化水素も使用できる。しかし、これらに限るものではなく、水に溶解性の低い溶媒であれば使用することができる。また、溶媒に限らず、水に不溶性又は難溶性のその他の液状物質、例えばビタミンEアセートその他の油状の薬物等も使用することができる。

【0039】(iii) 酸化剤： 酸化剤を使用する場合には、空気、酸素、過酸化水素、過ヨウ素酸ナトリウム、過臭素酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム、ヨウ素酸カリウムなどの、メルカプト基をジスルフィド結合に酸化し得るものを用いるのが好ましい。また、これら酸化剤と共に、酸化促進剤または触媒として、例えば鉄イオン、を併用することもできる。

【0040】〔3. マイクロカプセル形成の具体的方法例〕マイクロカプセルを形成させるための方法としては、以下の通り、既知のマイクロカプセル製造方法が種々使用できるが、粒径が微細且つ均一でありカプセル壁が極めて薄く且つ安定性が高いマイクロカプセルを簡便に製造することができるという点で、超音波法が特に好ましい。

【0041】(3-i) 超音波法： 超音波照射装置は

試料に超音波を照射することができる装置であればいずれの装置でもよいが、マイクロカプセルの生成効率を高めるには、チタンなど金属のプロープ先端より超音波を発生させるプロープ型の装置が好ましい。超音波照射条件は、試料の成分と体積により適宜調製するが、一般にケラチン含有水溶液と有機溶媒等の合計体積の10mLに対し、30乃至50Wにて10秒間乃至5分間照射すればよい。

【0042】なお、含ハロゲン炭化水素などを有機溶媒として用いると、マイクロカプセルの生成効率と含包効率が低くなる場合があるが、その場合には、超音波処理に先立って微量の過酸化水素などの酸化剤を添加しておけば、マイクロカプセルの生成効率を増加させることができる。

【0043】また、窒素ガスなど酸化能力を欠く気体の雰囲気下にて超音波処理し、生じた乳濁液の混合物に酸化剤を加えてもよい。この手法は、芯物質が酸化されやすい場合には、芯物質の酸化を防ぎつつマイクロカプセル化する効果があり、特に有用である。酸化剤の使用料はおおむね原料中のSH基1個に対し1乃至6倍の酸化剤分子の個数に相当する量である。

【0044】ケラチンとケラチン以外の壁材原料〔上記2.の(i-b)及び(i-c)〕の混合比は、ケラチンに対して1乃至500重量%用いることができるが、例えば、コラーゲンやゼラチン、フィブリノーゲンでは30乃至500重量%、シルクでは1乃至100重量%、SH基担持ポリビニルアルコールでは10乃至200重量%を用いる。有機溶媒量は、芯物質の溶解性に応じて変わるが、ケラチンと上記壁材原料の水溶液全量に対して0.1乃至5倍体積、通常は0.5乃至2倍体積を使用する。

【0045】(3-ii) 攪拌法： 壁材原料は超音波法と同様であるが、超音波操作の代わりにボルテックスミキサーで激しく振動させつつ攪拌するか、又は攪拌モーターにより激しく攪拌する。なお、処理前に酸化剤を微量(SH基1個に対し1乃至6倍の酸化剤分子個数)加えておくか、攪拌して生じた乳濁状の混合物に酸化剤を加え、その後、酸化剤がよく混ざるよう緩く攪拌してもよい。

【0046】(3-iii) pH調製による方法： 芯物質たる前記有機溶媒等をケラチン水溶液中に分散させ、これにクエン酸、酢酸等の酸を加えてpHを4乃至5付近に調整する。これにより、水溶性ケラチンは等電点に達して該芯物質を核にして凝集沈着しこれを包囲してマイクロカプセルの原型が形成される。ついで空気、酸素その他の酸化剤を導入・添加することにより、水溶性ケラチンの各分子のメルカプト基同士が酸化されてジスルフィド結合を形成し高分子化して不溶性の被膜となり、マイクロカプセルが形成される。

【0047】(3-iv) 噴霧乾燥法： 水溶性又は水

に不溶性の芯物質をケラチン水溶液中に溶解又は分散させ、これをスプレッドライヤーで噴霧し、熱風と接触させ水分を蒸発させて乾燥させることにより、マイクロカプセルが形成される。該方法は、水溶性及び水不溶性のいずれの物質をも芯物質としてマイクロカプセル化することができ、カプセル壁の不溶化も容易に行われるという利点を有する。

【0048】(3-v) コアセルベートの形成による方法： pH5以上に調整したケラチン水溶液中にpHのいかによらず負に荷電しているポリアニオン、例えばアラビアガムの水溶液を添加して希釈水溶液とし、これに水に難溶性又は不溶性の芯物質を分散させる。この系に酢酸、クエン酸等の酸を添加してpHを低下させることにより、ケラチン分子の荷電のみを負から正に変化させ、芯物質を核にして水溶性ケラチンとポリアニオンとの複合コアセルベートの膜を形成させる。次いで適宜酸化処理を行うことにより、この膜が水に不溶性となりマイクロカプセルが形成される。かかる複合コアセルベートを形成し得るポリアニオンの他の例としては、アルギン酸ナトリウム、寒天、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルメチルエーテル無水マレイン酸共重合体、ポリビニルベンゼンスルホン酸、ホルマリンとナフタレンスルホン酸との縮合物等、分子中に酸基を有するポリマーや界面活性剤等が挙げられる。

【0049】また、ケラチン水溶液に芯物質を分散させ、これにアルコール等又は無機塩類を添加することによって、芯物質を核として単純コアセルベート又はソルトコアセルベートの膜を形成させることができ、これを適宜酸化処理して不溶化させることによりマイクロカプセルが形成される。

【0050】(4. マイクロカプセルの単離) 上記(3-i)乃至(3-iii)、及び(3-v)で得られたマイクロカプセルの単離は次のようにして行うのが好ましい。

(4-i) 処理液をそのまま濃縮するか乾燥(凍結乾燥など)する。

【0051】(4-ii) 処理液を遠心して、マイクロカプセルを分離分画する。このままではマイクロカプセルの外部にマイクロカプセルの生成に与からなかった壁材原料や酸化剤などが不純物として残る場合があるため、また、マイクロカプセルを更に改質するため、マイクロカプセル画分に水や緩衝液を加えて攪拌後遠心し、再びマイクロカプセルを分離分画する。この操作を数回繰り返した後、マイクロカプセル分散液をそのまま利用するか、濃縮または乾燥(凍結乾燥など)する。

【0052】(4-iii) 処理液を、セロファン膜などの半透膜を利用して水や緩衝液あるいは香料、染料、生物活性薬物などを溶かした水溶液に対して、透析する。透析後の液をそのまま利用するか、濃縮または乾燥(凍結乾燥など)する。

【0053】以上により得られるマイクロカプセルの直径は、ケラチン含有水溶液の種類、ケラチン含有水溶液に対する有機溶媒の体積比、振動又は攪拌の与え方と時間などにより変動し一概に規定できないが、例えば、2.5重量%のケラチン水溶液とトルエンとの1:1体積混合物(20mL)を室温にて3分間、50Wにて超音波処理した場合は、1乃至3 μ mを主とした微小球であることが光散乱法により求められ、同サンプルを透過型電子顕微鏡で観察したところ、壁厚は約0.02 μ mの極めて薄い、紙風船様の形態であった。

【0054】

【実施例】次に実施例を挙げて更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例1) pH調節によるマイクロカプセル化:

製造例1で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.2重量%)500mL中に、ビタミンEアセテート5gを均一に分散させ、攪拌しながらこれに5%クエン酸水溶液を滴下して加えpH4にてケラチンを凝集させ、分散したビタミンEアセテートの周囲にマイクロカプセルの原型を形成させた。これを遠心分離により分離し、空気を吹き込んで乾燥しつつ空気酸化させ、更に減圧乾燥してマイクロカプセルを完成させた。得られたマイクロカプセルは、pHのいかにに関わりなく20℃の水に不溶であった。

【0055】(実施例2) 噴霧乾燥によるマイクロカプセル化:

製造例1で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.2重量%)500mLに、メチレンブルー2gを加えて分散させ、これをスプレードライヤーで噴霧し、熱風を接触させて水分を蒸発、乾燥させることにより、メチレンブルーの周囲に水に不溶性のケラチンの被膜を形成させてマイクロカプセル化を行った。

【0056】(実施例3) 広口試験管に製造例1で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.2重量%)10mLとトルエン10mLを加え、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25℃にて50Wの出力で3分間、超音波照射した。生じた白色懸濁液を3000回転/分で15分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質(約0.10g)は、透過型電子顕微鏡観察によれば比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚約0.02 μ m、直径1.2乃至1.5 μ mであった。白色粉末状物質の光散乱測定によってもほぼ同様の直径分布が示された。

【0057】(比較例1) 製造例1で得たケラチン水溶液の代わりに、特公昭59-33017号記載の方法によるケラチン加水分解物(平均分子量2200)を用いた以外は実施例3と同様にしてマイクロカプセル化を試みた。しかしながら、該水溶性ケラチン加水分解物より

得られた粒状物質は極めてもろく、その水中分散体は室温で放置するのみで崩壊し内部のトルエンを遊離してしまった。

【0058】(実施例4) 広口試験管に製造例2で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.4重量%) (10mL)とトルエン(10mL)を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25℃にて50Wの出力で3分間、超音波照射した。生じた白色懸濁液を3000回転/分で15分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質(約0.11g)は、透過型電子顕微鏡観察によれば、比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚は約0.02 μ m、直径は1.2乃至1.5 μ mである。白色粉末状物質の光散乱測定もほぼ同様の直径分布を示した。原料のケラチン水溶液を凍結乾燥して得たケラチン粉末のアミノ酸分析では、アミノ酸100残基当たりシステインが7.5個、システインが0.9個であったが、マイクロカプセルではシステイン含量が約8個に増加していた。他のアミノ酸残基は原料における値とほぼ一致した。

【0059】(実施例5) 広口試験管に製造例2で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.4重量%) (10mL)、30%過酸化水素水(0.05mL)とトルエン(10mL)を入れ、ボルテックスミキサーで25℃で5分間激しく振動攪拌した。生じた白色懸濁液を2000回転/分で15分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質(約0.11g)の透過型電子顕微鏡観察によれば、生じたマイクロカプセルの直径は、ややばらつくものの、3乃至10 μ mである。

【0060】(実施例6) 広口試験管に製造例2で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.4重量%) (10mL)とトルエン(10mL)を入れ、窒素ガス雰囲気下、25℃で5分間超音波処理した。生じた白色懸濁液に30%過酸化水素水(0.07mL)を加え、緩く振盪後、15分放置した。次いで2000回転/分で15分間遠心し、白濁固形物質を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、すぐ凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質(約0.11g)の透過型電子顕微鏡観察によれば、生じたマイクロカプセルの直径は、ややばらつくものの、2乃至5 μ mである。

【0061】(実施例7) 広口試験管にコラーゲン(タイプ1) (0.5%、コーケン社製、I-PC) (10mL)を入れ、28%アンモニア水で弱アルカリにした。ついで製造例2で得たケラチン水溶液(ケラチン濃度1.4重量%) (6mL)を加え、50℃にて10乃至15分間振盪した。当初ゲル化した混合物が流動液とな

った後、トルエン（10 mL）を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25℃にて35 Wの出力で3分間、超音波照射した。生じた白色懸濁液を2000回転/分で15分間遠心し、白色固形物を分離し、水（20 mL）を加え、攪拌後、更に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、白色懸濁液を凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質（約0.10 g）は透過型電子顕微鏡観察によれば、比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚は約0.02 μ m、直径1.5乃至3 μ mである。この白色粉末状物質の光散乱測定もほぼ同様の直径分布を示した。

【0062】（実施例8）広口試験管にメルカプト基を担持したポリビニルアルコール（分子量2000、SH基1乃至3個）の2.5%水溶液（3 mL）をいれ、次いで製造例2で得たケラチン水溶液（ケラチン濃度1.4重量%）（20 mL）を加え、十分に振動攪拌した。次いでシリコン油（ALDRICH社）を2重量%溶解した1-フルオロシクロヘキサン（10 mL）を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25℃にて50 Wの出力で3分間、超音波処理した。生じた白色懸濁液を2000回転/分で15分間遠心し、白濁固形物を分離し、純水（5 mL）に分散保存した。同分散液を凍結乾燥すると、約0.28 gの粉末が得られた。分散液は、電子顕微鏡観察によれば、比較的均一な粒子を含み、光散乱測定によれば、2乃至8 μ mの主たる直径分*

*布を示した。上記遠心処理で分離した有機溶媒層が約1乃至2 mLと少ない上、その濃縮により得られた残渣のシリコン量が使用量の5乃至20%であることから、シリコンがマイクロカプセルに含包されていることは明らかである。

【0063】（実施例9）実施例4のトルエンの代わりにビタミンKの3重量%トルエン溶液（10 mL）を用いる他は、全く同じ操作でマイクロカプセルを得た（0.30 g）。マイクロカプセルのエタノール分散液の紫外吸収スペクトル測定より、使用したビタミンKの70%がマイクロカプセルに含包されていることが明らかとなった。

【0064】〔試験例1〕ケラチン膜からのケラチンの剥離量：

ガラス表面に、製造例2の方法で得たケラチン水溶液と特公昭59-33017号記載の方法による水溶性ケラチン加水分解物（同濃度：平均分子量2200）とを用いて、それぞれケラチン薄膜（厚さ約100 μ m）を調製した。これをpH7.4のトリス塩酸緩衝液に浸し、40℃にて振盪した。水溶液を一定量採取し、溶解したタンパク質量をLowry法で定量し、剥離量を産出した。結果を表1に示す。

【0065】

【表1】

振盪時間	製造例2で得た ケラチン薄膜	特公昭59-33017の方法 で得たケラチン薄膜
1	0 %	30 %
5	0 %	90 %
24	2 %	100 %
72	3 %	—
120	5 %	—

【0066】なお、特公昭59-33017号に記載の方法による平均分子量15000の水溶性ケラチン加水分解物を用いてケラチン薄膜の調製をも試みたが、製膜化は困難であった。

【0067】

【発明の効果】以上の通り、本発明によれば、天然ケラチンを壁材とし、壁厚が薄くしかも安定性が高い極めて微細且つ均一な粒径の高い含包量を有するマイクロカプセルを容易に製造することができる。また本発明のマイ

クロカプセルは、ケラチン加水分解物を壁材とする公知技術のマイクロカプセルと比較して、マイクロカプセルの製造効率、安定性等において格段に優れる。更に、本発明のマイクロカプセルは、天然のケラチン鎖間の架橋を一旦切離し、再びこれを形成してなる再生天然ケラチンを壁材とするものであって、ケラチン鎖自身の切断等の非可逆的化学修飾を伴わないものであるため、生体適合性の点で好ましく、既述の通り多方面での利用が可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

B 0 1 J 13/02

C 0 8 L 89/04

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

L S E

7415-4J